

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- BLANK PAGES

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-30791

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)2月3日

C 12 N 15/51
C 07 K 13/00
C 12 P 21/02

ZNA

C

7731-4H
8214-4B
8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全18頁)

⑮ 発明の名称 構造蛋白質遺伝子、組換えベクター、組換えウイルス、ポリペプチドおよびポリペプチドの製造方法

⑯ 特 願 平2-137223

⑰ 出 願 平2(1990)5月29日

⑱ 発 明 者	下 遠 野 邦 忠	東京都中央区築地5-1-1	国立がんセンター研究所内
⑱ 発 明 者	加 藤 宜 之	東京都中央区築地5-1-1	国立がんセンター研究所内
⑱ 発 明 者	土 方 誠	東京都中央区築地5-1-1	国立がんセンター研究所内
⑱ 発 明 者	九 内 健 志	山口県徳山市御影町1番1号	徳山曹達株式会社内
⑱ 発 明 者	菊 池 匡 芳	山口県徳山市御影町1番1号	徳山曹達株式会社内
⑲ 出 願 人	下 遠 野 邦 忠	東京都中央区築地5-1-1	
⑲ 出 願 人	徳山曹達株式会社	山口県徳山市御影町1番1号	
⑳ 代 理 人	弁理士 平木 祐輔	外1名	

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

構造蛋白質遺伝子、組換えベクター、組換えウイルス、ポリペプチドおよびポリペプチドの製造方法

2. 特許請求の範囲

1. 下記のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子。

TrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProArgArgGlyPro
AsnAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIle
AspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIle
ProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgThrLeu
AlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAla
ThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeu
AlaLeuLeuSerCysLeuThrIleProAlaSerAlaTyrGlu
ValArgAsnValSerGlyIleTyrHisValThrAsnAspCys
SerAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspMetIleMet
HisThrProGlyCysValProCysValArgGluSerAsnPhe
SerArgCysTrpValAlaLeuThrProThrLeuAlaAlaArg
AsnSerSerIleProThrThrThrIleArgArgHisValAsp

LeuLeuValGlyAlaAlaAlaLeuCysSerAlaMetTyrVal
GlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValSerGlnLeuPhe
ThrPheSerProArgArgTyrGluThrValGlnAspCysAsn
CysSerIleTyrProGlyHisValSerGlyHisArgMetAla
TrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuVal
ValSerGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaValValAspMet
ValAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyLeuAlaTyr
TyrSerMetValGlyAsnTrpAlaLysAlaProIleValMet
LeuLeuPheAlaGlyValAspGlyHisThrHisValThrGly
GlyArgValAlaSerSerThrGlnSerLeuValSerTrpLeu
SerGlnGlyProSerGlnLysIleGlnLeuValAsnThrAsn
GlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAsnCysAsnAsp
SerLeuGlnThrGlyPheIleAlaAlaLeuPheTyrAlaIle
ArgPheAsnAlaSerGlyCysProGluArgMetAlaSerCys
ArgProIleAspGluPheAlaGlnGlyTrpGlyProIleThr
HisAspMetProGluSerSerAspGlnArgProTyrGlyLeu
AspAspAlaProArgProArgGlyIleAlaAlaAlaSerGln
ValCysGlyProGluTyrCysPheThrPro

2. 下記の塩基配列を含むC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子。

GATGGCTCCTGTCACCCCGAGGCTCCCGGCTAGAGGGG
 CCCTAACGACCCCGGGCTAGGTCGGCTAATCTGGGTAAG
 GTCATCGATACCCCTACATGCGGCTTCGCGACCTCATGG
 GGTACATTCCGCTTGTGCGGCGCCCGCTAGGAGGGCTGG
 CAGGACCTTGGCGATGGGCTCCGGGTTCTGGAGGACGGC
 GTCAACTATGCAACAGGGAATCTGCCCGGTTGCTCTTTCT
 CTATCTTCTCTTAGCTTTGCTGTCTTTTGACCATCCC
 AGCTTCCGCTTACGAGGTGGCGAACGCTGTCGGGATATAC
 CATGTCAAGAACGACTGCTCCAACTCAATATTGTGTATG
 AGCCAGCGGACATGATCATGACACCCCGGGTGGCTGCC
 CTGCGTCCGGGAGAGTAATTTCTCCCGTTGCTGGCTAGCG
 CTCACCTCCACGCTCCGGGCGAGAACAGCAGCATCCCCA
 CCACGACAAATACGACCGGACGCTCGATTGCTCGTTGGGG
 GGCTGCTCTCTGTTCCGCTATGTACGTTGGGGATCTCTGC
 GGATCCGTTTCTCTGCTTCCAGCTGTTACCTTCTCAC
 CTCGCGGCTATGAGACGGTACAAGATTGCAATTGCTCAAT
 CTATCCCGGCGACGATCAGGTACCCGATGGCTTGGGAT
 ATGATGATGAACGCTGCTACCTACAACGGGCTAGTGGTAT
 CGCAGCTACTCCGGATCCCAAGCGCTCGTGGACATGGT
 GCGCGGGGCGCACTCGGGTGTCTAGCGGGCTTGCTTAC

TATTCATGCTCGGGAACGCTGGGCTAAGGCTCCGATTGTGA
 TGCTACTCTTTGCTGGGTTGACCGGCGACACCCACGTGAC
 AGGGGGAAGGGTAGCCTCCAGCACCCACAGCCTCGTGTCC
 TGGCTCTCAAGGCCATCTCAGAAAATCCAACCTGTCGA
 ACACCAACGGCAGCTGGGACATCAACAGGACCGCTCTGAA
 TTGCAATGACTCCCTCCAACTGGGTTCAATTGCTGGGCTG
 TTCTACGGACACAGGTTCAACGGCTCCGGGTGCCACAGGC
 GCATGGCTAGCTCGCGGCGCATCGATGAGTTGCTGCTAGGG
 GTGGGGTCCCATCACTCATGATGCTGAGAGCTCGGAC
 CAGAGGCGATATGGGCTCGACGCGCGGCTCGACCGCGCG
 GGATCGCTGCTCGCTCGGAGGTGTGCTGCTCAGACTATTG
 CTTCACTCCGA

3. C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子を含む領域を、バキュロウイルスの多角体蛋白質遺伝子のプロモーターを含む転移ベクターに挿入して得た組換え転移ベクター。
4. C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子を含む領域を、バキュロウイルスの多角体蛋白質遺伝子のプロモーターを含む転移ベクターに挿入し

て組換え転移ベクターとバキュロウイルスとを昆虫細胞に感染導入して得た、該構造蛋白質遺伝子を含む領域を含む組換えウイルス。

5. C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子を含む領域を、バキュロウイルスの多角体蛋白質遺伝子のプロモーターを含む転移ベクターに挿入して組換えベクターを調製し、ついで該組換えベクターとバキュロウイルスとを昆虫細胞に感染導入して、該構造蛋白質遺伝子を含む領域を有する組換えウイルスを調製し、更に該組換えウイルスを昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させて、ポリペプチドを得ることを特徴とするHCV抗原活性ポリペプチドの製造方法。

6. 下記のアミノ酸配列を含むHCV抗原活性ポリペプチド(1)。

TrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProArgArgGlyPro
 AsnAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIle
 AspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIle
 ProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgThrLeu
 AlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAla

ThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeu
 AlaLeuLeuSerCysLeuThrIleProAlaSerAlaTyrGlu
 ValArgAsnValSerGlyIleTyrHisValThrAsnAspCys
 SerAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspMetIleMet
 HisThrProGlyCysValProCysValArgGluSerAsnPhe
 SerArgCysTrpValAlaLeuThrProThrLeuAlaAlaArg
 AsnSerSerIleProThrThrThrIleArgArgHisValAsp
 LeuLeuValGlyAlaAlaAlaLeuCysSerAlaMetTyrVal
 GlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValSerGlnLeuPhe
 ThrPheSerProArgArgTyrGluThrValGlnAspCysAsn
 CysSerIleTyrProGlyHisValSerGlyHisArgMetAla
 TrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuVal
 ValSerGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaValValAspMet
 ValAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyLeuAlaTyr
 TyrSerMetValGlyAsnTrpAlaLysAlaProIleValMet
 LeuLeuPheAlaGlyValAspGlyHisThrHisValThrGly
 GlyArgValAlaSerSerThrGlnSerLeuValSerTrpLeu
 SerGlnGlyProSerGlnLysIleGlnLeuValAsnThrAsn
 GlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAsnCysAsnAsp
 SerLeuGlnThrGlyPheIleAlaAlaLeuPheTyrAlaHis

ArgPheAsnAlaSerGlyCysProGluArgMetAlaSerCys
ArgProIleAspGluPheAlaGlnGlyTrpGlyProIleThr
HisAspMetProGluSerSerAspGlnArgProTyrGlyLeu
AspAspAlaProArgProArgGlyIleAlaAlaAlaSerGln
ValCysGlyProGluTyrCysPheThrPro

7. 下記のアミノ酸配列を含むHCV抗原活性ポリペプチド(II)。

MetProAsnTyrSerTyrThrProThrIleGlyArgThrTyr
ValTyrAspAsnLysTyrTyrLysAsnLeuGlyCysLeuIle
LysAsnAlaLysArgLysLysHisLeuValGluHisGluArg
GluPheArgTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProArg
ArgGlyProAsnAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGly
LysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMet
GlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAla
ArgThrLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyVal
AsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIle
PheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrIleProAlaSer
AlaTyrGluValArgAsnValSerGlyIleTyrHisValThr
AsnAspCysSerAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAsp
MetIleMetHisThrProGlyCysValProCysValArgGlu

SerAsnPheSerArgCysTrpValAlaLeuThrProThrLeu
AlaAlaArgAsnSerSerIleProThrThrThrIleArgArg
HisValAspLeuLeuValGlyAlaAlaAlaLeuCysSerAla
MetTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValSer
GlnLeuPheThrPheSerProArgArgTyrGluThrValGln
AspCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisValSerGlyHis
ArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThr
AlaLeuValValSerGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaVal
ValAspMetValAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGly
LeuAlaTyrTyrSerMetValGlyAsnTrpAlaLysAlaPro
IleValMetLeuLeuPheAlaGlyValAspGlyHisThrHis
ValThrGlyGlyArgValAlaSerSerThrGlnSerLeuVal
SerTrpLeuSerGlnGlyProSerGlnLysIleGlnLeuVal
AsnThrAsnGlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAsn
CysAsnAspSerLeuGlnThrGlyPheIleAlaAlaLeuPhe
TyrAlaHisArgPheAsnAlaSerGlyCysProGluArgMet
AlaSerCysArgProIleAspGluPheAlaGlnGlyTrpGly
ProIleThrHisAspMetProGluSerSerAspGlnArgPro
TyrGlyLeuAspAspAlaProArgProArgGlyIleAlaAla
AlaSerGlnValCysGlyProGluTyrCysPheThrProArg

AsnSerArg

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はC型肝炎の病因であるC型肝炎ウイルス(以下HCVと略記する場合がある)の構造蛋白質遺伝子領域をもとに、C型肝炎患者血清中に存在するC型肝炎ウイルスに対する抗体(抗HCV抗体)に対して、抗原性を有するポリペプチドを製造する方法に関するものであり、具体的に説明すれば、C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子領域を、バキュロウイルスの多角体蛋白質遺伝子のプロモーターを含む転移ベクターに挿入して組換え転移ベクターを調製し、ついで該組換え転移ベクターとバキュロウイルスとを昆虫細胞に同時感染導入して、該構造蛋白質遺伝子領域を含む組換えウイルスを調製し、更に該組換えウイルスを昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させて、ポリペプチドを得ることを特徴とするポリペプチドの製造方法、およびそのポリペプチドに関し、更に上記構造蛋白質遺伝子、それを含む組換え転移ベ

クターおよび組換えウイルスに関する。

〔従来の技術〕

輸血後非A非B肝炎を起こした患者の血清をもとに、C型肝炎ウイルスの遺伝子の一部がクローニングされ、これが米国カイロン社のホートンらによりサイエンスに報告された[Science, Vol. 244, pp359-362, (1989).]。更に、彼らはC型肝炎ウイルスの非構造蛋白質領域をコードする遺伝子の一部を、酵母の発現ベクターに挿入し、酵母でこの遺伝子を発現させることに成功した。この方法により生産される非構造蛋白質の一部分は、C型肝炎患者血清中に存在する、抗HCV抗体に対して抗原性を有する[The Lancet, Vol. 335, pp. 1-3, 1990.]。この性質により、この蛋白質はC型肝炎の診断用抗原として利用されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

酵母で生産された抗原性蛋白質は、C型肝炎患者血清中に存在する抗HCV抗体と反応するものの、この抗HCV抗体はC型肝炎が発症してなお6カ月程度を経て、はじめて陽性となるものであ

ることが分かってきた。また、この抗原を用いて正常人血清あるいはC型肝炎患者血清を試験すると、凝陽性または凝陰性を示す場合があることも分かってきた[The Lancet, Vol. 335, pp. 754-757, (1990), および臨床科学、25巻、7号、827ページ、1990年]。このため、より精度の高い診断が可能となる、新しい有用な抗原性を有するポリペプチドの開発が求められている。

【課題を解決するための手段】

C型肝炎は、C型肝炎ウイルスによって引き起こされる肝炎であり、輸血後非A非B肝炎のほとんどは、この肝炎であるといわれている。そして、その多くは更に肝癌へと病状が進行する。C型肝炎ウイルスは遺伝子の長さ約10kb(1万ヌクレオチド)のRNAウイルスと考えられ、フラビウイルスの仲間であると推定されている。このことから考えると、5'末端側から約1.5kb(約1500ヌクレオチド)の部分が高糖蛋白質遺伝子部分に相当し、残りが非構造蛋白質遺伝子部分に相当する。また約1.5kbの高糖蛋白質遺伝子部分は、フラビ

ウイルスの遺伝子構造との比較により、コア蛋白質遺伝子領域(C)、膜蛋白質遺伝子領域(M)、外皮蛋白質遺伝子領域(E)の3部分に機能的に分かれるものと考えられている。

C型肝炎ウイルスの遺伝子の全塩基配列の報告はまだないが、非構造蛋白質遺伝子を主体とした配列が、カイロン社によって、ヨーロッパ特許EP 0318216に報告されている。

C型肝炎ウイルスについての総合的な知見はこれまでに全く得られておらず、こういう状況のもとでは、いかなる遺伝子領域を、いかなる宿主ベクター系にのせると、有用な抗原性を有するポリペプチドを、効果的に得られるのか全く不明である。我々はこれまでにホートンらにより利用されてきた非構造蛋白質遺伝子領域ではなく、新たに構造蛋白質遺伝子領域について、その遺伝子発現を鋭意研究してきた。その結果、昆虫の宿主ベクター系を用いることにより、C型肝炎患者血清中に存在する抗HCV抗体に対し、特異性の高い有用な抗原性を有するポリペプチドを得ることに成

功した。

即ち本発明は、次の構成を含むものである。

1. 下記のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子。

TrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProArgArgGlyPro
AsnAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIle
AspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIle
ProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgThrLeu
AlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAla
ThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeu
AlaLeuLeuSerCysLeuThrIleProAlaSerAlaTyrGlu
ValArgAsnValSerGlyIleTyrHisValThrAsnAspCys
SerAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspMetIleMet
HisThrPrpGlyCysValProCysValArgGluSerAsnPhe
SerArgCysTrpValAlaLeuThrProThrLeuAlaAlaArg
AsnSerSerIleProThrThrThrIleArgArgHisValAsp
LeuLeuValGlyAlaAlaAlaLeuCysSerAlaMetTyrVal
GlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValSerGlnLeuPhe
ThrPheSerProArgArgTyrGluThrValGlnAspCysAsn
CysSerIleTyrProGlyHisValSerGlyHisArgMetAla

TrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuVal
ValSerGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaValValAspMet
ValAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyLeuAlaTyr
TyrSerMetValGlyAsnTrpAlaLysAlaProIleValMet
LeuLeuPheAlaGlyValAspGlyHisThrHisValThrGly
GlyArgValAlaSerSerThrGlnSerLeuValSerTrpLeu
SerGlnGlyProSerGlnLysIleGlnLeuValAsnThrAsn
GlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAsnCysAsnAsp
SerLeuGlnThrGlyPheIleAlaAlaLeuPheTyrAlaHis
ArgPheAsnAlaSerGlyCysProGluArgMetAlaSerCys
ArgProIleAspGluPheAlaGlnGlyTrpGlyProIleThr
HisAspMetProGluSerSerAspGlnArgProTyrGlyLeu
AspAspAlaProArgProArgGlyIleAlaAlaAlaSerGln
ValCysGlyProGluTyrCysPheThrPro

2. 下記の塩基配列を含むC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子。

GATGGCTCCTGTACACCCCGAGGCTCCCGGCTAGACGGCG
CCCTAACGACCCCGCGGTAGGTCCCGTAATCTCGGTAAG
GTCATCGATACCTCACATGCGGCTTCGCGACCTCATCG
GCTACATTCCGCTTGTCCGCGCCCGCTAGGACGGCGCTGC

CAGGACCCTGGCGCATGGCGTCCGGTTCGGAGGACGGC
 GTGAACATGCAACAGGGAATCTGCCCGGTTCCTTTCT
 CTATCTTCTCTTAGCTTTGCTGCTTTGACCATCCG
 AGCTTCCGCTTACGAGGTGGCAACGTGTCCGGGATATAC
 CATGTCAAGAACGACTGCTCCAACCTCAAGTATTGTCTATG
 AGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGCCTGCC
 CTGCGTCCGGGAGAGTAATTTCTCCCGTTGCTGGGTAGCG
 CTCACCTCCACGCTCGCGGGCAGGAACAGCAGCATCCCA
 CCACGACAATACGACCCCACTCGATTGCTCGTGGGGC
 GGTGCTCTCTGTTCCGCTATGTACGTTGGGATCTCTGC
 GGATCCGTTTCTCTGCTCCACGCTGTTACCTTCTCAC
 CTCGCGGCTATGAGACGGTACAAGATTGCAATTGCTCAAT
 CTATCCCGCCACGCTATCAGGTACCGCATGGCTTGGGAT
 ATGATGATGAACGCTGCTACCAACGGCCCTAGTGCTAT
 CGCAGCTACTCCGGATCCACAGCGCTCGTGGACATGGT
 GCGCGGGGGCCACTGGGCTGCTACCGGGCTTGGCTAC
 TATTCCATGCTGGGAACTGGGCTAAGGCTCCGATTGTA
 TGCTACTCTTTGCTGGGTTGACGGGCACACCCACGTGAC
 AGGGGGAAGGGTAGCCTCCAGCACCCAGAGCTCGTCTC
 TGGCTCTCAAGGCCCATCTCAGAAAATCCAACCTCGTA

ACACCAACGGCAGCTGGCACAATCAACAGGACCGCTCTGAA
 TTGCAATGACTCCCTCCAAATGGGTTCATTGCTGCCGTG
 TTCTACGCACACAGGTTCAACGGCTCCGGTCCCAAGGC
 GCATGGCTAGCTGCCGCCCATCGATGAGTTGCTCAGCG
 GTGGGGTCCCATCACTCATGATATGCTTGAGAGCTCGGAC
 CAGAGGGCAATATGGGCTCGACGCGGCTCGACCGGGC
 GGATCGCTGCTGCGTCCAGGCTGCTGCTCCAGAGTATTG
 CTTCACTCCGA

3. C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子を含む領域を、バキュロウイルスの多角体蛋白質遺伝子のプロモーターを含む転移ベクターに挿入して得た組換え転移ベクター。
4. C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子を含む領域を、バキュロウイルスの多角体蛋白質遺伝子のプロモーターを含む転移ベクターに挿入して組換え転移ベクターとバキュロウイルスとを昆虫細胞に感染導入して得た、該構造蛋白質遺伝子を含む領域を含む組換えウイルス。
5. C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子を含む

領域を、バキュロウイルスの多角体蛋白質遺伝子のプロモーターを含む転移ベクターに挿入して組換えベクターを調製し、ついで該組換えベクターとバキュロウイルスとを昆虫細胞に感染導入して、該構造蛋白質遺伝子を含む領域を有する組換えウイルスを調製し、更に該組換えウイルスを昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させて、ポリペプチドを得ることを特徴とするHCV抗原活性ポリペプチドの製造方法。

6. 下記のアミノ酸配列を含むHCV抗原活性ポリペプチド(1)。

TrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProArgArgGlyPro
 AsnAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIle
 AspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIle
 ProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgThrLeu
 AlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAla
 ThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeu
 AlaLeuLeuSerCysLeuThrIleProAlaSerAlaTyrGlu
 ValArgAsnValSerGlyIleTyrHisValThrAsnAspCys
 SerAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspMetIleMet

HisThrProGlyCysValProCysValArgGluSerAsnPhe
 SerArgCysTrpValAlaLeuThrProThrLeuAlaAlaArg
 AsnSerSerIleProThrThrThrIleArgArgHisValAsp
 LeuLeuValGlyAlaAlaAlaLeuCysSerAlaMetTyrVal
 GlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValSerGlnLeuPhe
 ThrPheSerProArgArgTyrGluThrValGlnAspCysAsn
 CysSerIleTyrProGlyHisValSerGlyHisArgMetAla
 TrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuVal
 ValSerGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaValValAspMet
 ValAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyLeuAlaTyr
 TyrSerMetValGlyAsnTrpAlaLysAlaProIleValMet
 LeuLeuPheAlaGlyValAspGlyHisThrHisValThrGly
 GlyArgValAlaSerSerThrGlnSerLeuValSerTrpLeu
 SerGlnGlyProSerGlnLysIleGlnLeuValAsnThrAsn
 GlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAsnCysAsnAsp
 SerLeuGlnThrGlyPheIleAlaAlaLeuPheTyrAlaHis
 ArgPheAsnAlaSerGlyCysProGluArgMetAlaSerCys
 ArgProIleAspGluPheAlaGlnGlyTrpGlyProIleThr
 HisAspMetProGluSerSerAspGlnArgProTyrGlyLeu
 AspAspAlaProArgProArgGlyIleAlaAlaAlaSerGln

ValCysGlyProGluTyrCysPheThrPro

7. 下記のアミノ酸配列を含むHCV抗原活性ポリペプチド(II)。

MetProAsnTyrSerTyrThrProThrIleGlyArgThrTyr
ValTyrAspAsnLysTyrTyrLysAsnLeuGlyCysLeuIle
LysAsnAlaLysArgLysLysHisLeuValGluHisGluArg
GluPheArgTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProArg
ArgGlyProAsnAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGly
LysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMet
GlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAla
ArgThrLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyVal
AsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIle
PheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrIleProAlaSer
AlaTyrGluValArgAsnValSerGlyIleTyrHisValThr
AsnAspCysSerAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAsp
MetIleMetHisThrProGlyCysValProCysValArgGlu
SerAsnPheSerArgCysTrpValAlaLeuThrProThrLeu
AlaAlaArgAsnSerSerIleProThrThrThrIleArgArg
HisValAspLeuLeuValGlyAlaAlaAlaLeuCysSerAla
MetTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValSer

GlnLeuPheThrPheSerProArgArgTyrGluThrValGln
AspCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisValSerGlyHis
ArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThr
AlaLeuValValSerGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaVal
ValAspMetValAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGly
LeuAlaTyrTyrSerMetValGlyAsnTrpAlaLysAlaPro
IleValMetLeuLeuPheAlaGlyValAspGlyHisThrHis
ValThrGlyGlyArgValAlaSerSerThrGlnSerLeuVal
SerTrpLeuSerGlnGlyProSerGlnLysIleGlnLeuVal
AsnThrAsnGlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAsn
CysAsnAspSerLeuGlnThrGlyPheIleAlaAlaLeuPhe
TyrAlaHisArgPheAsnAlaSerGlyCysProGluArgMet
AlaSerCysArgProIleAspGluPheAlaGlnGlyTrpGly
ProIleThrHisAspMetProGluSerSerAspGlnArgPro
TyrGlyLeuAspAspAlaProArgProArgGlyIleAlaAla
AlaSerGlnValCysGlyProGluTyrCysPheThrProArg
AsnSerArg

本発明でいう構造遺伝子領域とは、C型肝炎ウイルスのC領域、M領域、E領域を指すが、非構造遺伝子部分と構造遺伝子領域の区分は、現在ま

だはっきりと特定されていない。しかしながらカイロン社の発表した遺伝子部分は、ほぼ非構造蛋白質遺伝子部分に相当すると考えられており、これより上流の約1.5 kbの領域が、構造蛋白質遺伝子領域とされる。

この領域は、輸血後非A非B肝炎患者【血液中のアラニンアミノトランスフェラーゼ(CPT)値が150を示した患者】の血清を用いて作成したcDNAライブラリーから、得ることが出来る。具体的には、患者血清からRNAを分離し、該RNAに対して逆転写酵素を使用して、一本鎖のcDNAを合成、更にカイロン社の発表【EP 0318216】した塩基配列の14~73番目まで(コーディング鎖)を持つプライマーと、297~321番目まで(逆鎖)を持つプライマーとをセットしてPCR法による遺伝子増幅を行い、得られた遺伝子のクローンの塩基配列を解析する。次に、それをもとにカイロン社の塩基配列171~190に相当する、新しい塩基配列のプライマーを作成し、 λ gt11ファージを利用して、患者の血清のcDNAライブラ

リーを調製する。次に、カイロン社の147~171番目の塩基配列を持つプローブを作成し、そのcDNAライブラリーに対して、ブラックハイブリダイゼーションを行なうことにより得られるものである。

C型肝炎ウイルスの遺伝子の塩基配列については、これまでに数例の報告しかないが、その中で加藤、大越、下遠野らは、1989年に日本のC型肝炎ウイルスとアメリカのC型肝炎ウイルスとの塩基配列の相違を指摘し、日本型とアメリカ型のC型肝炎ウイルスが存在することを報告している。

[Proceedings of the Japan Academy, Vol. 65, Ser. B, No 9, pp. 219~223 (1989).]

本発明に用いるC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子領域は、日本型、アメリカ型を問わず、全てのC型肝炎ウイルスの遺伝子が、広く利用できる。但し、日本型C型肝炎ウイルスの遺伝子を用いれば、日本型のC型肝炎ウイルスに感染したC型肝炎の診断に特に有用となり、抗HCV抗体に対して抗原性を有する有用なポリペプチドが得ら

れる。ここで、該構造蛋白質遺伝子領域はクローニングによって得られたものでも良く、また有機合成的に合成されたものであっても良い。

本発明でいう構造蛋白質遺伝子領域とは、C型肝炎ウイルスの約1.5 kbの構造蛋白質遺伝子部分であれば日本型、アメリカ型を問わず、また位置も長さも特に限定されない。但し、第1図に示す1251塩基の構造蛋白質遺伝子領域の全部または一部の領域を用いる場合は、特に有用な抗原性を有するポリペプチドを得ることができる。

第1図に示す1251塩基の配列は、日本人のC型肝炎の患者血清よりクローニングして得たHCV SP4断片の塩基配列を示しており、日本型C型肝炎ウイルスに由来する遺伝子である。そのため、第1図の配列は特に日本型C型肝炎ウイルスの抗体を検出するのに有用な領域である。

第1図に1251塩基の構造蛋白質遺伝子領域のDNA塩基配列と、対応するアミノ酸への翻訳配列を示すが、第1図は本発明にいう構造蛋白質遺伝子領域を示す例であり、本発明は何等この配列に

限定されない。更に、第1図に示された領域は、遺伝子地図上で同一な位置づけをされる、他の日本型あるいはアメリカ型のC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子の領域をも代表して示すものであり、それらについても本発明に含まれる。

また第1図に示す構造蛋白質遺伝子領域の全部あるいは一部について、その塩基配列の一部の領域が、置換あるいは挿入、欠失したものであっても、その遺伝子発現により生産される有用な抗原性を有するポリペプチドの性質が、本配列によって示されるものと実質的に同等である場合は、本発明に含まれる。更に第1図の配列について、コドンのゆらぎの範囲内、即ち第1図のアミノ酸配列を変えない範囲内で塩基が変化した配列については、第1図の塩基配列と実質的に同一と見なされ、本発明に含まれる。

本発明でいうバキュロウイルスには種々あるが、本発明ではAutographa californica nuclear polyhedrosis virusやBombyx mori nuclear polyhedrosis virusが利用でき、それぞれのウイル

スは宿主昆虫として Spodoptera frugiperdaや Bombyx mori に感染する。このうち、Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus (以下、BmNPVと略す場合がある) は、カイコ核多角体病ウイルスとして知られており、このウイルスはカイコ Bombyx mori に感染するため、宿主としてカイコが好適に利用できる。

本発明でいうBmNPVは要証業者に広く知られており、前田、古沢らの分離した代表的な株にT3株があり、このウイルスのDNAは米国ATCCにNo.40188として寄託されている。またBmNPVに感染したカイコから、公知の方法によって分離することもできる。このBmNPVの遺伝子DNAのうち、本発明においてC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子領域と組換えられる部分は、多角体蛋白質遺伝子の一部である。本発明を完成させる際にもちいたBmNPVについて、遺伝子地図と制限酵素地図を第2図に示す。

多角体蛋白質遺伝子のプロモーターを含む転移ベクターは特に限定されるものではなく、Auto-

grapha californica nuclear polyhedrosis virusや Bombyx mori nuclear polyhedrosis virusについて、これまでに開発されてきた種々の転移ベクターも利用可能である。C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子領域は、多角体蛋白質遺伝子のプロモーターの下流に挿入される。但し、第1図に示す1251塩基の領域を遺伝子発現させる場合は、この領域が遺伝子の翻訳のための開始コドンを持たないため、転移ベクターの内部、即ち多角体蛋白質遺伝子のプロモーターの下流に開始コドンを持つ転移ベクターが好適に利用できる。その目的のためには、前田らが開発したpPEベクター、特開昭64-74990号に示されるpBFベクターが好適に利用できる。

pBFベクターはBmNPVの多角体蛋白質遺伝子のプロモーター、および多角体蛋白質遺伝子の一部すなわち多角体蛋白質遺伝子の前後と、大腸菌用ベクターとして知られるpUCベクターから構成されている。この様にpBFベクターは大腸菌ベクターpUCに由来する大腸菌体内での転

要開始領域を含んでおり、そのため大腸菌を使った通常の遺伝子操作を行うことにより、組換え転移ベクターを得ることが出来る。

第1図に示す1251塩基の領域を遺伝子発現させる場合、pBFベクターのうち、特にpBF124は、該構造蛋白質遺伝子領域と蛋白質翻訳のフレームが一致するために優れている。転移ベクターpBF124の構造を第3図に示す。

転移ベクターpBFを利用する場合、C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子領域を、pBF転移ベクターのクローニング部位に挿入して、組換え転移ベクターを調製する。pBFベクターのクローニング部位にはEcoRI、XbaI、SmaI制限部位があるが、途中で終止コドンが入らない限り、そのどれを用いる事もできる。特にC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子領域として、1251塩基の断片を用いる場合は、その両末端にEcoRIリンカーを結合させ、pBF124のEcoRI部位に挿入することが出来る。

このようにして1251塩基の両末端にEcoRIリン

カーを接続し、これを転移ベクターpBF124のEcoRI部位に、遺伝子の向きを順方向に向けて挿入して得た組換え転移ベクターはpHC1244と名付けられ、更にこの組換え転移ベクターを用いて大腸菌JM109を形質転換した具体例は、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) HCV1244であり、この菌は茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院微生物工業技術試験所に平成2年5月22日付で寄託され、微工研菌寄第11471号 (FERM P-11471) なる番号が付されている。

本発明では、組換え転移ベクターとBmNPVとを、カイコ樹立細胞にカルシウム沈澱法を用いて同時に感染させ (コトランスフェクション)、組換え転移ベクターとBmNPVの両方に存在する、塩基配列の相同性の高い対立遺伝子領域の間で、遺伝子の相同組換えを起こさせる。この方法により、BmNPVの核多角体蛋白質の一部が、C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子領域に置き換えられた、組換えウイルスを得ることが出来る。

組換え転移ベクターとBmNPVとを、カイコ

樹立細胞にカルシウム沈澱法を用いて同時に感染させる方法は、前田らが特開昭61-9297号公報に発表している方法で行うことが出来る。また、同時感染により得られた反応液の上清から組換えウイルスを分離する方法は、ブランクアッセイ法 [J. Seric. Sci. Jpn. Vol. 53, p. 547 (1984). に示される] や、リミテイング希釈法 [特願昭63-152375号に示される] により分離することが出来る。

本発明では *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* や *Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus* などのバキュロウイルスが利用できるが、それぞれのウイルスは宿主昆虫として *Spodoptera frugiperda* や *Bombyx mori* に感染する。特に *Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus* を利用する場合は、このウイルスがカイコ *Bombyx mori* に感染するため、カイコ樹立培養細胞あるいはカイコ幼虫が利用される。

カイコ樹立培養細胞としては、BmNPVが増殖可能なものであれば特に制限なく利用できるが、ATCC、NCRL-8910株や、前田らの開発し

たBm・N2株、Bm・N4株などは好適に利用できる、取り扱いの容易さの点からBm・N4株は特に好適に利用できる。カイコ樹立培養細胞は公知の方法、例えば牛胎児血清を含むTC-10培地中で培養するなどの方法により、培養できる。

本発明では、組換えウイルスを昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させて、目的とする有用な抗原性を有するポリペプチドを得ることが出来る。組換えウイルスのカイコ樹立培養細胞への感染方法は、例えばカイコ樹立培養細胞の培養液を容器にいれ、該細胞の容器の底面に沈着させて後、容器の底面に付着しているカイコ樹立培養細胞がはがれないように、古い培養液を抜き取り、組換えウイルス液を滴下し、室温で1時間程度静置した後、牛胎児血清を含む新しいカイコ培養培地を添加するという、公知の方法が一般的である。その後例えば27度で組換えウイルスを培養後、遠心分離して、培養細胞を沈澱物として得る。この細胞は、抗HCV抗体に対して抗原性を有する有用なポリペプチドを含有するので、これを精製することに

より、目的のポリペプチドを得ることが出来る。

組換えウイルスをカイコ幼虫に感染させる方法は、特に限定されないが、感染させる幼虫としてはカイコ5令幼虫が好ましい。感染方法としては経皮注射が一般的である。

カイコの飼育期間は、組換えウイルスに感染後、3～5日が目安であり、抗HCV抗体に対して抗原性を有する有用なポリペプチドは、カイコ幼虫を解剖し、下腹部に蓄積している脂肪体を取り出すか、あるいはカイコ幼虫をすりつぶすなどの作業の後、通常の蛋白質の分離精製システムを利用して精製後、得ることができる。

転移ベクターとしてpB Fベクターを用いた場合は、調製された組換えウイルスは、多角体蛋白質のN末端から始まる一部の遺伝子領域の後ろに、C型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子領域が融合している。このため該組換えウイルスがカイコ細胞あるいは幼虫に感染すると、多角体蛋白質遺伝子のプロモーターが作用し、多角体蛋白質の一部とC型肝炎ウイルスの構造蛋白質との融合蛋白質が作られることになる。

質が作られることになる。

こうして出来た融合蛋白質は、抗HCV抗体に対して抗原性を有する有用なポリペプチドとして利用でき、通常はその遺伝子構造から予想される分子量、即ち開始コドンから終止コドンまでの分子量に相当する蛋白質が得られる。しかしながら、例えば125I塩基の塩基配列を持つ構造蛋白質遺伝子領域など、構造蛋白質遺伝子領域の中の同じフレーム上に存在する、コア蛋白遺伝子領域、膜蛋白遺伝子領域、外皮蛋白遺伝子領域の境界にまたがる様な長い遺伝子領域を用いて、カイコで発現させる場合には、開始コドンから終止コドンまでに対応する分子量の大きな蛋白質以外に、分子量の小さな断片が得られることがある。この原因は不明であるが、ひと続きの長い構造遺伝子領域がカイコなどの真核細胞内で遺伝子発現すると、翻訳後にコア蛋白部分、膜蛋白部分、外皮蛋白部分などの境界領域や、その他分解され易い場所で、プロテアーゼによる切断が起こるのかもしれない。こうして得られる小さなポリペプチドは、いずれ

も抗HCV抗体に対して抗原性を有する有用なポリペプチドとして利用できる。

(発明の効果)

本発明によりC型肝炎ウイルスの抗体に特異的に反応する有用な抗原性を有するポリペプチドを効率よく生産することが出来る。こうして得られたポリペプチドは、C型肝炎の診断薬として利用できるが、C型肝炎の診断薬として完全なものがない現在、本発明はきわめて大きい意義を持つ。

本発明により得られた有用な抗原性を有するポリペプチドは、C型肝炎の患者血清中に存在する抗C型肝炎ウイルス抗体を特異的に認識するため、凝集法による診断用抗原や、酵素抗体法(ELISA)による診断用抗原として応用できる。

(実施例)

以下に本発明を具体的に例示するために実施例を示すが、本発明の範囲はこの実施例に限定されるものではない。

実施例1

(RNAの調製)

輸血後非A非B患者血清3000mlを19,000rpmで16時間超遠心し、沈殿を得た。該沈殿物をGITC溶液100mlに溶解し、該溶解物100mlに対して、100mlのフェノール-クロロホルム(1:1)を加え、15分間室温で振盪後、3000rpm、15分間遠心した。該反応液の水層を取り出し、水層100mlに対して、isopropyl alcohol 100 mlを加え、-20℃に3時間放置した。放置後、3000rpm、15分間遠心し、沈殿物を得た。

該沈殿物に対して、GITC溶液10mlを加え、溶解させる。該溶解液に対して、10mlのフェノール-クロロホルム(1:1)を加え、10分間室温で振盪後、3000rpm、15分間遠心した。該反応液の水層を取り出し、水層10mlに対して、クロロホルム20mlを加え、5分間振盪した。振盪後、3000rpm、5分間遠心し、水層10mlを得た。該水層10mlを取り出し水層10mlに対して、5M NaCl溶液0.4 mlを加えた。

混合した後、30mlの水冷エタノールを添加し、-20℃で12時間放置した。放置後、3000rpm、15

分間遠心し、沈殿物を得た。該沈殿物を75%エタノールで洗浄し、乾燥後、蒸留水 200 μ l に溶解し、RNA溶解液を得た。

尚、G1TC溶液の組成は、4M グアニジウムイソチオシアネート（フルカ製）、25mM クエン酸ソーダ、0.5% サルコシル、0.1M メルカプトエタノールである。

（PCR法による遺伝子増幅）

得られたRNA溶液 4 μ l に、逆転写酵素反応液 [250mM Tris-HCl (pH8.3), 375mM KCl, 50mM DTT, 15mM MgCl₂] 2 μ l、塩基配列が (5') AGTT CATCCAGGTACAACCGAACCA(3') で示される25塩基のプライマー溶液 1 μ l (100ng/ μ l)、4種類のデオキシヌクレオチド [dATP, dGTP, dCTP, dTTP、各15mM] を各 0.5 μ l ずつ加えて、9 μ l の溶液を作った。

これにミネラルオイルを加えて、70℃、2分間加熱し、ついで37℃に冷却し、逆転写酵素 1 μ l (BRL社製品) を加え、37℃で60分反応させた。

この反応液 (10 μ l) に、更にPCR反応液

[400mM Tris-HCl (pH8.8), 100mM 硫酸アンモニウム, 40mM 塩化マグネシウム, 60mM メルカプトエタノール, 0.1% BSA] 8.3 μ l、4種類のデオキシヌクレオチド [dATP, dGTP, dCTP, dTTP、各15mM] を各 5 μ l ずつ、塩基配列 (5') AGGCTAGCCA GCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGCCCTATC AGTTA(3') で示される60塩基のプライマー溶液 1 μ l (100ng/ μ l)、塩基配列 (5') AGTTCATCCA GGTACAACCGAACCA(3') で示される25塩基のプライマー溶液 1 μ l (100ng/ μ l)、水 0.7 μ l を加え、全量49 μ l の溶液とした。

この溶液 92℃、5分間処理し、室温に冷却してTaqポリメラーゼ 1 μ l (2単位、New England Biolabs社製品) を加えた。以下、アニール (55℃、45秒)、ポリメリゼーション (72℃、2分)、変性 (90℃、1分) を、35回繰り返して、DNAの増幅を行った。なお、本方法で使用したプライマーを、カイロン社がEP0318216に発表したHC Vの遺伝子の塩基配列番号で示せば、以下の通りである。まず60塩基のものは、14~73番目のコー

ディング頭に相当し、つぎに25塩基のものは 297~321番目の逆順に相当する。

以下、PCR法により増幅した遺伝子産物のクローニングについて述べるが、このクローニングの方法はマニアティスらの方法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982).] に従って行った。まず増幅した遺伝子産物 (307塩基対) をアガロースゲル (2%) で電気泳動し、これから目的の長さのDNAを回収した。ついでこれをKlenow fragment 酵素処理し、DNAの末端を平滑に揃え、更にT4ポリヌクレオチドキナーゼにより、5'末端をリン酸化した。これをプラスミドベクター pTZ19RのHincII部位に挿入し、遺伝子のクローニングを行った。ついで、得られたクローンの307塩基の配列を決定した。

決定した塩基配列をもとに、20塩基のオリゴヌクレオチド (5') GCGCTCGGACTGAACCAATA(3') [カイロン社の発表した配列の171~190番目の逆順に相当する] と、24塩基のオリゴヌクレオチド (5')

GCGTCGGAGGTGTGTGCTCCACTG(3') [カイロン社の発表した配列の147~170番目のコーディング頭に相当する] の2種類を合成した (アプライドバイオシステムズ社製品、340A型機を使用した)。

（cDNAライブラリーの構築）

cDNA合成はBRL社の合成キットを使用した。その方法はcDNA合成マニュアル [BRL/コスモバイオ社 Instruction Manual, Cat. No 8267SA] に従って行った。本実施例の (RNAの調製) の項で、非A非B患者血清より調製した1本鎖RNA溶液 5 μ l に、20塩基のオリゴヌクレオチドを 5 μ l (100 μ M) 加え、逆転写酵素反応を行わせて、RNA/DNAの2本鎖とした。次いで大腸菌DNAポリメラーゼIと、大腸菌RNA分解酵素Hとを加え、DNA/DNA 2本鎖とした。

次に、こうして得られた2本鎖DNAの両末端にEcoRI リンカーを結合させた。この処理には宝酒造の酵素を用い、宝酒造の酵素に添付されている反応条件で反応を行った。まず2本鎖DNA約

1 μ gを用いて、EcoRI メチラーゼ処理を行い、その後T4 DNAリガーゼ反応によりEcoRI リンカー d (GGAATTCC) を結合させた。最後に得られた反応液をEcoRIで切断し、EcoRI断片を回収した。

最後にこの EcoRI断片を λ gt11のEcoRI 部位に挿入し、組換え λ gt11ファージを作成したが、これにはStratagene社のキットGIGAPACK II GOLDを用い、方法はキットに添付されているマニュアル [Protocol/Instruction Manual Cat. #200214, 200215, 200216, December 6, 1989] に従った。まず λ gt11のEcoRI部位にEcoRI断片を挿入し、これをT4 リガーゼにより結合させた。得られた組換えファージDNA溶液を GIGAPACK II GOLD の In Vitro Packaging Kit を用いて、ファージに戻した。この時のタイターを測定した所 1.2 \times 10⁸ であった。このタイター値は、独立したクロソンの数を示す。

(ブランクハイブリダイゼーション)

ブランクハイブリダイゼーションの方法はマニアティスらの方法 [Molecular Cloning, Cold

Spring Harbor Laboratory, New York (1982).] に従って行った。まず大腸菌 Y1090をホストとし、直径15cmのプレート10枚に、得られた組換え λ gt11ファージ5 \times 10⁸ 相当を出現させた。得られたブランクを、ニトロセルロースに写し取り、24塩基のオリゴヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。こうして、1 kb以上の挿入断片をもつクローン8株を選択し、この中で最も長い断片を持つクローンを1株選び出した。そして、このクローンのDNAをとり、EcoRI で切断して、約1.2kb の断片を回収した。この断片はプラスミドベクター pTZ19R の EcoRI部位にのせ換えた。

この組換えプラスミドをpHCVSP4と名付け、更にこのプラスミドの EcoRI断片の塩基配列を直接調べた。このためにデリーションプラスミドを構築したが、これはヤニシュ・ベロンらの方法 [Gene, Vol. 33, pp.103-119 (1985).] に従い、またプラスミド法による塩基配列の決定は服部らの方法 [Anal. Biochem., Vol. 152, pp.232-238

(1986).] に従った。こうしてpHCVSP4のEcoRI断片、約1.2kbの塩基配列を決定した。この結果を第1図に示す。なお、第1図には、対応するアミノ酸配列も示す。この遺伝子断片のEcoRIリンカーを除いた領域をSP4と呼び、この領域は1251塩基から成る。

実施例2

(組換え転移ベクターの製造)

第1図に示すHCV構造遺伝子領域SP4が、大腸菌ベクターpTZ19のEcoRI部位に挿入された、プラスミドpHCVSP4を大量調製し、その200 μ gを第1表のNo.1に示す組成の溶液に溶解し、次いでEcoRI制限酵素(宝酒造製No.1040S)を断続的に9時間添加していき、切断反応を行った。

アガロースゲル電気泳動により切断反応の終了を確認後、該HCVSP4切断溶液に対してラージスケールのアガロースゲル電気泳動を行った。そして、HCV構造遺伝子を含むEcoRI-EcoRI断片に相当するバンド部分の寒天片を切り出し、電

気泳動による溶出によって該断片を抽出した。次いで、抽出液を更にフェノール抽出し、エタノール沈殿してHCV構造遺伝子を含むEcoRI-EcoRI断片を50 μ g得た。

第1表

No.1	50mM Tris-HCl (pH7.5) 10mM MgCl ₂ 100mM NaCl 1mM ジチオエリスリトール
No.2	33mM Tris-acetate (pH7.9) 10mM Mg-acetate 66mM K-acetate 0.5mM ジチオエリスリトール

一方、カイコの実験系ベクターpBF124, 10 μ gを第1表No.1に示す組成の溶液に溶解し、次いでEcoRI制限酵素を断続的に9時間添加していき、切断反応を行った。

次いで得られた反応液にアルカリフォスファターゼ(宝酒造製No.2120)1 μ gを加え、60℃で

30分間反応させた。アルカリフォスファターゼ反応停止後、該反応液をフェノール抽出、エタノール沈澱し、EcoRI制限酵素で切断されたpBF124 5 μ g 得た。

そして、該ベクター 0.2 μ g と前記HCV構造遺伝子を含む EcoRI-EcoRI断片 2 μ g とをDNAライゲーションキット(宝酒造製 No6021)を用いてライゲーションを行った。

そして該操作により得られた接続反応液25 μ ℓ を大腸菌JM 109株コンピテントセル懸濁液 200 μ ℓ に添加し、氷上で30分放置した。その後42℃で2分間ヒート・ショックし、更に氷上で5分間放置した後、LB液体培地 800 μ ℓ を添加し、37℃で1時間おだやかに振盪培養した。

該液体培地100 μ ℓ をアンピシリン100 μ g/ μ ℓ を含むLB液体培地 1.5 μ ℓ に接種し、37℃で8時間培養した。それぞれの液体培地から1 μ ℓ ずつ採取し、各採取培地中の大腸菌内に所在するプラスミドをミニプレペレーション法により抽出した。得られた各プラスミドのそれぞれをEcoRI制限酵

素で切断反応を行った。反応後、各反応液をアガロースゲル電気泳動し、HCV構造遺伝子を含む EcoRI-EcoRI断片がpBF124 に挿入しているプラスミドを見出した。

そして、更にHCV構造遺伝子を含むEcoRI-EcoRI断片がpBF124 に挿入しているプラスミドを第1表No2に示す組織の溶液に溶解し、次いで、SmaI制限酵素(宝酒造製 No1085A)およびHpaI制限酵素(宝酒造製 No1064S)の両制限酵素を同時に添加して、切断反応を行った。反応後、各反応液をアガロースゲル電気泳動し、HCV構造遺伝子を含む EcoRI-EcoRI断片がpBF124 に正しい方向に挿入しているプラスミドを確認した。

この確認したプラスミドを所有している大腸菌が存在する培養液から 0.2 μ ℓ を採取し、アンピシリン100 μ g/ μ ℓ を含むLB液体培地50 μ ℓ に接種後、37℃で12時間培養した。

該液体培地中の大腸菌内に存在するプラスミドをミディアム・プレペレーション法により抽出し、組換えベクター-pHC1244 200 μ g を得た。

以上の工程を第5図に示す。

(組換えウイルスの製造)

BmNPV T3 株のウイルスDNAと前記組換えベクター-pHC1244とが1:100のモル比に調整された第2表の組成液 I 245 μ ℓ を第2表の組成液 II 255 μ ℓ と混合した。

第 2 表

組成液 I

蒸留水	135 μ ℓ
キャリア DNA(鮭精製, 1 μ g/ μ ℓ)	50 μ ℓ
Bm NPV T3株 DNA(0.15 μ g/ μ ℓ)	20 μ ℓ
pHC 1244 懸濁液 (1 μ g/ μ ℓ)	10 μ ℓ
2 M 塩化カルシウム液	30 μ ℓ
	245 μ ℓ

組成液 II

0.28 M 塩化ナトリウム含有の 50 mM HEPES 緩衝液(pH7.1) リン酸緩衝液	250 μ ℓ
(35 mM Na ₂ HP04-35 mM Na ₂ HPO4)	5 μ ℓ
	255 μ ℓ

生じた懸濁液0.5 μ ℓ をTC-10(第3表)培地で培養しているカイコ樹立培養細胞 Bm N4液(4 \times 10⁵ Bmcells/ μ ℓ)5 μ ℓ に加え、27℃、3時間の培養により、pHC1244と Bm NPV DNAのカイコ樹立細胞への導入を行った。

該DNAが導入されたBmN4細胞に TC-10培地の交換を行った後、27℃で5日間培養した。次いでこの培養物を遠心分離(1500rpm, 10分間)し、得られた培養上清を組換えウイルスクローニング用反応液とした。

該当クローニング用反応液をTC-10 培地で10⁻²、10⁻³、10⁻⁴に希釈し、それぞれ10 μ ℓ の希釈反応液とした。該希釈反応液10 μ ℓ に対して、それぞれカイコ樹立培養細胞BmN4液(10⁵ Bmcells/ μ ℓ) 10 μ ℓ を混合し、該混合液を 200 μ ℓ ずつ96穴のマイクロタイター・トレーの中に文注し、27℃で5日間培養した。5日間培養後、マイクロタイター・トレーを検鏡し、細胞表面が粗く変形し、ウイルスが感染した形態を示しているカイコ樹立培養細胞で且つ該細胞内に多角体タンパクが検出されないウ

第 3 表

エルを見出し、そこから培養物を回収した。得られた培養ものを遠心分離し、上清 150 μ l を組換えウイルスのポリペプチド発現用反応液とした。該反応液は、ブランク検定で 1×10^4 PFU/ml の力価を示す組換えウイルス液であった。尚、このポリペプチド発現用反応液を用い、組換えウイルスのカイコ樹立細胞BmN4への感染、培養を行い、組換えウイルスを増殖させた。この組換えウイルスの増殖操作は、培養物の遠心分離(1500rpm, 10分)による上清液14mlが、ブランク検定で 1×10^4 PFU/ml の力価を有するまでくり返し行った。

上記TC-10の培地は、第3表の培地900mlに対し硫酸カナマイシン(高有製薬工業)60mgを添加し、次いで、pH6.30~6.35に調整し、濾過滅菌後、牛胎児血清100mlを添加することにより調整される。

(本頁以下余白)

培 地・組 織	
NaCl	0.5 g
KCl	2.87 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.32 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2.28 g
MgCl ₂ · 7H ₂ O	2.78 g
Tryptose	2.0 g
デキストロース (glucose)	1.1 g
L-glutamine	0.3 g
soln A*	100 ml
soln B**	100 ml
soln C***	1 ml
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (0.891 g/100ml)	100 ml
NaHCO ₃ (0.35 g/100ml)	100 ml

H₂Oで全量 900mlとする

* soln Aの組成

L-Arginine	5.79 g
L-Aspartic acid	3.5 g
L-Asparagine · H ₂ O	3.98 g
L-Alanine	2.25 g
β -Alanine	2.0 g
L-Glutamic acid	6.0 g
L-Glutamine	3.0 g
Glycine	6.5 g
L-Histidine	25.0 g
L-Isoleucine	0.5 g
L-Leucine	0.75 g
L-Lysine · HCl	6.25 g
L-Methionine	0.5 g
L-Proline	3.5 g
L-Phenylalanine	1.5 g
DL-Serine	11.0 g
L-Threonine	1.75 g
L-Valine	1.0 g

H₂Oで全量1000mlとする

** soln Aの組成

L-Cystine	0.25 g
L-Tryptophane	1.0 g
L-Tyrosine	0.5 g

H₂Oで全量1000mlとする

*** soln Aの組成

Thiamine · HCl	2.0mg
Riboflavine	2.0mg
D-Ca pantothenate	2.0mg
Prydoxine · HCl	2.0mg
Para-aminobenzoic acid	2.0mg
Folic acid	2.0mg
Nicotinitol	2.0mg
Iso-Inositol	2.0mg
Biotin	1.0mg
Choline Cl	20.0mg

H₂Oで全量1000mlとする

(ポリペプチドの製造)

カイコ樹立培養細胞BaN4を75cm²の培養フラスコ(コーニング製)で培養し、 3×10^8 Bncells/フラスコになるまで27℃で培養する。次いで、培養したカイコ樹立培養細胞BaN4が容器の底面からはがれないように培地を抜きとり、更に、上記増殖させた組換えウイルス液5mlを添加し、室温で1時間感染する。感染後、TC-10培地10mlを添加し、27℃、5日間培養した。5日間培養後培養物を回収し、遠心分離(1500rpm, 15分)した。

沈殿物(ウイルス成熟細胞)をPBS緩衝液で洗浄し、50mM Tris-HCl(pH7.4)10mlに懸濁、ソニケーション後、延伸分離(8000rpm, 20分)した。沈殿物として得られたポリペプチド90μgにレムリ緩衝液200μlを添加、懸濁したものを、煮沸し、遠心した上清をSDSゲル電気泳動の試料とした。

こうしてSDS電気泳動を行ったゲルを用いて、ウエスタンブロッティング分析を行った。ゲルからの蛋白質のブロッティングは、アトー社製製品ホライズプロット装置を用いて電気的に行い、

膜はイモビロンP.V.D.F.トランスファーマンブレン(ミリポア社製品)を用いた。また、その方法はアンダーセンらの方法[J. Biochem. Biophys. Methode, Vol. 10, p203(1984).]に従って行った。

こうして蛋白質がブロッティングされたイモビロンP.V.D.F.トランスファーマンブレンに対して、一次抗体として正常人血清、または輸血後非A非B肝炎患者血清をそれぞれ反応させ、更にアビジン/ビオチン化酵素複合体法により、分析を行った。この実験はトービンらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., Vol. 76, p4350(1979).]に従って行った。

(本頁以下空白)

第 4 表

一 次 抗 体	二 次 抗 体
正 常 人 血 清 (×10)	ビオチン化抗IgG抗体 (×100) (Vector社製 BA-3000)
抗多角体ウイルス抗体 (×100)	ビオチン化抗IgG抗体 (×100) (Vector社製 BA-7000)
非A非B肝炎 患者血清 (×100)	ビオチン化抗IgG抗体 (×100) (Vector社製 BA-3000)

その結果、正常人血清を使用した場合には陽性なバンドは見られなかったが、輸血後非A非B肝炎患者血清使用した場合には、分子量約50キログルトン(kd)に相当するバンド、約45kdに相当するバンド、約21kdに相当するバンドが検出された。

なお、50kdの分子量は、遺伝子構造から推定される融合蛋白質の分子量、すなわちpBFI24に由来するカイコ多角体蛋白質遺伝子がコードする蛋白質部分の分子量と、HCV構造蛋白質遺伝子領域に由来する蛋白質部分の分子量の合計分子量に相当する。

実施例 3

実施例1で得た増殖させた組換えウイルス液を、50μlずつ5台1日目のカイコ100匹に、それぞれ経皮的に接種し、27℃で14日間、桑葉のベースト片を与えて飼育後、解剖し、脂肪体を集めた。この脂肪体にリン酸バッファー生理食塩水(PBS)10mlを加えて洗浄後、再度50mM Tris-HCl(pH7.4)を10ml加えて懸濁し、超音波砕後、遠心分離して沈殿物20mgを得た。

この沈殿物に対し、実施例1と同じ方法により、SDS電気泳動を行い、更にウエスタンブロッティング分析を行った。この分析に用いた抗体は、1次抗体2次抗体とも、実施例1と同じものを用いた。

その結果、正常人血清を使用した場合には陽性なバンドは見られなかったが、輸血後非A非B肝炎患者血清を使用した場合には、分子量約50キログルトン(kd)に相当するバンド、約45kdに相当するバンド、約21kdに相当するバンドが検出された。

実施例 4

(ポリペプチドの分析)

カイコ樹立培養細胞BmN4を225mlの培養フラスコ(コーニング株製)で培養し、 1×10^7 Bm cells/フラスコになるまで27°Cで培養した。それを30フラスコ用意した。次いで、培養したカイコ樹立培養 BmN4 が容器の底面からはがれないように培地を抜きとり、更に増殖させた組換えウイルス(BmNPV F4)液15mlをそれぞれ添加し、室温で1時間感染した。感染後、TC-10培地30mlをそれぞれ添加し、27°C、5日間培養した。

5日間培養後、培養物を回収し、遠心分離(1500rpm, 15分)した。得られた沈殿物をPBS緩衝液で洗浄し、50mM Tris-HCl(pH7.4) 200mlに懸濁し、ソニケーション後、遠心分離(8000rpm, 20分)した。

該沈殿物に対して、RIPA(-SDS)緩衝液 200mlに再懸濁し、ソニケーションした後、遠心分離(8000rpm, 20分)した。該沈殿物に対してレムリ緩衝液3mlを添加、懸濁したものを煮沸し、遠心した(8000rpm, 20分)遠心した上清に対して、SDS

ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを2M KCl 溶液に浸漬し、分子量50kdの位置に出現した白色バンドを切り出し、0.1M トリス、0.1M トリシン、0.1% SDSの溶出液を使用して電氣的に溶出した。これによって、2mgのポリペプチドを含む溶液が得られた。

該溶液1mg分をイモビロンPVDFTランスファームンブレン(ミリポ社製)にSpotし、アトー社製品ホライズプロット装置を用いてブロッティングを行った。また、その方法は Paul Matsudairaの方法 [The Journal of biological chemistry, Vol. 262, No 21, pp. 10035~10038 (1987).]に従って行った。

クーマシーブルー R-250(Σ社製)で染色されたスポットを切り出し、ABI model 477A/120A アミノ酸配列決定システム(ABI社製)を使用したアミノ酸配列を決定した。尚、キャリアーとしてパイオプレンプラス(ABI社製)を用いた。

またポリペプチド溶液1mg分を凍結乾燥した。該凍結乾燥物に対して6N HClを加えて溶解し、

105°C、22時間加水分解した。

該加水分解物に対して日立 835型アミノ酸分析システム(日立製作所製)を使用して、アミノ酸組成を分析した。

尚、RIPA(-SDS)緩衝液の組成は、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1% NP-40、0.1% Sodium deoxy cholate、0.15M NaCl、1mM EDTA、2mM PMSF、1% Triton-X、1mM dithiothreitol(DTT)である。

こうして決定されたポリペプチドのN末端から34残基までのアミノ酸配列の結果を下に示すが、これは遺伝子から予想される配列と同一である。

Met Pro Asn Tyr Ser Tyr Thr Pro Thr Ile
Gly Arg Thr Tyr Val Tyr Asn Asn Lys Tyr
Tyr Lys Asn Leu Gly Xxx Leu Ile Lys Asn
Ala Lys Arg Lys

またアミノ酸組成の分析結果を以下に示すが、これも遺伝子構造から予想されるものとはほぼ同じであった。以下、アミノ酸の種類、1分子あたりのアミノ酸組成の実測値(配列からの予想値)の順に示すと、Gly 3.75(38)、Ala 42(41)、Val 33

(35)、Leu 40(40)、Ile 19.5(20)、Met 15(14)、Phe 15(14)、Pro 30(29)、Ser 38(39)、Thr 27(27)、Asp 19(19)、Glu 12(12)、Lys 10(9)、His 14(14)、Arg 32(34)、Tyr 20(19)であった。以上の結果から、得られたポリペプチドは第4図に示すアミノ酸配列をもつポリペプチドと確認された。

なお、第4図に対応する遺伝子構造も示した。この図の、遺伝子の塩基番号1~126まではpBF124に由来するカイコ核多角体蛋白質の遺伝子領域であり、番号127~133と番号1385~1391の2箇所はλgt11組換えファージ作成の時に用いたEcoRIリンカーに由来する遺伝子領域であり、134~1384までの1251塩基はC型肝炎ウイルス構造蛋白質遺伝子領域であり、番号1392~1398はpBFBクターのカイコ核多角体遺伝子の最後の領域に相当するものである。

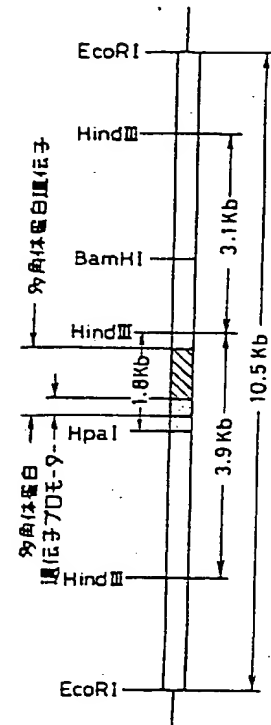
4. 図面の簡単な説明

第1図はHCVの構造蛋白質遺伝子及びそれに対応するアミノ酸配列を示す図、第2図はBmNPVの遺伝子地図と制限酵素地図を示す図、第3図は

転移ベクター pBF 124の構造を示す図、第4図はカイコ核多角体蛋白質の遺伝子の一部を付加したHC Vの構造蛋白質遺伝子およびそれに対応するアミノ酸配列を示す図、第5図は組み換えベクター pHCl244 の構築図である。

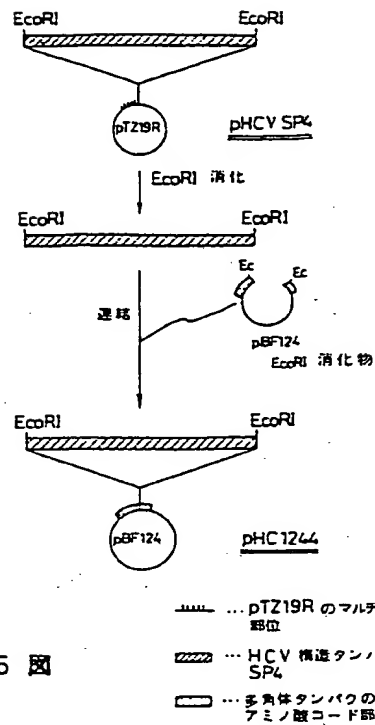
出願人 下 遠 野 邦 忠
出願人 徳 山 曹 達 株 式 会 社
代理人 弁 理 士 平 木 祐 輔
同 弁 理 士 石 井 貞 次

第 2 図



第 1 図

CATGCTCTGTACCCGAGGCTCCGCGCTAGAGCGGCGCTAACGACCCCGCGCTA
 TrpLeuSerProArgGlySerArgProArgGlyProAsnAspProArgAla
 CGTCGGTATCTGGGTAACTCATCGATACCTCAGATCGGCTCGCGCGCTCGC
 rSerArgAsnLeuGlyValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetG
 GTACATTCGCGCTTGTCCGCGCGCTAGAGCGGCTCGCGCGCTCGCGCATGCGC
 GlyTrpLeuLeuValGlyValProLeuGlyValIleAspThrLeuAlaHisGlyV
 TCGGCGTCTGGAGAGCGGCTCACTATCAGAGCGGCTAACGACCCCGCGCTTCTTCT
 AlaValLeuGlyAspGlyValAsnTrpAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheS
 CTATCTCTCTTACCTTGTCTCTCTTGTACATCCGCGCTTACGAGTCC
 erIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrIleProAlaSerAlaTrpGluValA
 GCAAGCTCTCGGATATACATCATCAGAGAGCGCTCTCACTCACTCACTGATTGTGATG
 rAsnValSerGlyIleTrpAlaValThrAsnAspCysSerAspSerIleValTrpG
 AGCAGCGGACATCATCATCACCGCGCGCTCGCGCTCGCGCTCGCGGAGACTATT
 leAlaIleAspMetIleMetIleThrProGlyCysValProCysValAlaGluSerAsp
 TCTCCGCTTCTGGGTACGCTCAGCTCCGCGCTCGCGCTCGCGCTCGCGCTCGCGT
 hSerArgCysTrpValIleLeuThrProThrLeuAlaIleArgAspSerIleProT
 CCAGCAGATACGAGCGGCTCGCTTGTCTCGGCGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 hThrThrIleArgAsnValAspLeuLeuValGlyAlaIleAlaLeuCysSerAlaM
 TCTACGCTCGGATCTCTCGGATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 ellyValGlyAspLeuGlyGlySerValPheLeuValSerGlnLeuPheThrPheSerP
 CGCGCGGTATCAGAGGTACAGATTCGCAATCTCACTATCTCGCGCGCTCGCGTATCAG
 rArgArgTrpGluThrValGlnAspAspCysSerIleTrpProGlyHisValSerG
 GTACCGCATGCTTGGGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 lHisArgMetAlaTrpAspMetIleMetIleThrProGlyCysValProCysValAlaGluSerAsp
 CGCAGCTCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCT
 erGluLeuLeuArgIleProGlnAlaValAspMetIleAlaIleAlaHisTrpGlyV
 TCTACGCGGCTCTCGGATCTCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGA
 aIleAlaGlyLeuAlaTrpTrpSerMetValGlyAspTrpAlaIleAlaPheValM
 TCTACTCTTCTCGCGCTTGCAGCGGACACCGCGCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGA
 rGluLeuPheAlaGlyValAspGlyAlaThrHisValThrGlyTrpAlaSerS
 GCACCCAGCGCTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCT
 erThrGluSerLeuValSerTrpLeuSerGlnGlyProSerGlnValIleGlnLeuValA
 ACACACCGCGGCTCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGG
 saThrArgGlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAspCysAspSerLeuGlnT
 CTGGCTTCTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCT
 hGlyPheIleAlaIleAlaPheThrAlaHisArgPheAspAlaSerGlyCysProGlnA
 GCATCGGTACCTCGCGCTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCT
 rMetAlaSerCysArgProIleAspGlyPheAlaGlnGlyTrpGlyProIleThrHisA
 ATATCGCTGAGAGCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGGATCTCGG
 sMetProGlnSerSerAspGlnArgProTrpGlyLeuAspAlaProArgProArgC
 GCATCGCTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCT
 llyIleAlaIleAlaSerGlnValCysGlyProGlyTrpCysPheThrPro



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl.⁹

//(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号